

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 55-039730

(43)Date of publication of application : 19.03.1980

---

(51)Int.Cl. C12P 7/66  
// C12R 1/01

---

(21)Application number : 53-111934

(71)Applicant : RES INST FOR PROD DEV

(22)Date of filing : 11.09.1978

(72)Inventor : MOCHIDA KOICHI  
SHIMIZU SHIN  
KOBAYASHI TATSUJI

---

(54) PREPARATION OF UBIQUINONE Q10

## (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain ubiquinone O10 (U) useful as medicines industrially advantageously, by culturing ubiquinone-proclucing bacteria which belong to the genus Rhodopseudomonas in a nutrient medium containing given amounts or more of biotin and thiamine, and by collecting U from the cultured bacterium bodies.

CONSTITUTION: Microorganisms, e.g. Rhodopseudomonas ( FERM-P No.879 ), which belong to the genus Rhodopseudomonas, and have the ability to produce ubiquinone Q10(U), are cultured in a nutrient medium containing more than 5m $\mu$  moles of biotin and more than 0.2 $\mu$  mole of thiamine at 20W40° C and a pH of 5W 9, preferably  $\leq 7$ . After the culturing, bacterium bodies are collected, and extracted with an organic solvent or by saponification to give an extract containing U. The extract is then fractionated by column chromatography or partitioned and extracted with an organic solvent to concetrate the U fraction, which is crystallized from ethanol.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

## ⑫ 特 許 公 報 (B2) 昭56-34278

⑤ Int.Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭公告 昭和56年(1981)8月8日

C 12 P 7/66  
 //(C 12 P 7/66  
 C 12 R 1/01)

6760-4B

発明の数 1

(全4頁)

1

⑤4 ユビキノン $Q_{10}$ の製造法

⑥1特 願 昭53-111934

⑥2出 願 昭53(1978)9月11日

公 開 昭55-39730

⑥3昭55(1980)3月19日

⑥7発 明 者 持田晃一

寝屋川市東香里園町8-10

⑥7発 明 者 清水伸

京都市左京区下鴨塚本町3

⑥7発 明 者 小林達治

京都市左京区浄土寺真如町137

⑥1出 願 人 財団法人生産開発科学研究所

京都市左京区下鴨森本町15番地

## ⑥7特許請求の範囲

1 ロドシウドモナス属に属するユビキノン $Q_{10}$ を生産する能力を有する微生物を、該微生物の栄養培地中にビオチン $5\text{ m}\mu\text{モル}$ を超える濃度及びチアミン $0.2\text{ }\mu\text{モル}$ を超える濃度で存在させて培養しユビキノン $Q_{10}$ の含有量を増加せしめた菌体からユビキノン $Q_{10}$ を採取することを特徴とするユビキノン $Q_{10}$ の製造法。

## 発明の詳細な説明

本発明は発酵法によるユビキノン $Q_{10}$ の製造法に関する。さらに詳しくは、本発明はロドシウドモナス属に属するユビキノン $Q_{10}$ を生産する能力を有する微生物を、該微生物の栄養培地中にビオチン $5\text{ m}\mu\text{モル}$ を超える濃度及びチアミン $0.2\text{ }\mu\text{モル}$ を超える濃度で存在させて培養し、ユビキノン $Q_{10}$ の含有量を増加せしめた菌体からユビキノン $Q_{10}$ を採取することを特徴とするユビキノン $Q_{10}$ の製造法に関する。

その目的は医薬品として近年適応症の拡大しつつあるユビキノン $Q_{10}$ の工業的に有利な製造方法を提供することにある。

従来、発酵法によるユビキノン $Q_{10}$ の製造法に

2

関しては、各種の細菌、酵母、糸状菌を培養し菌体中からユビキノン $Q_{10}$ を抽出する方法が報告されている。本発明者は既にロドシウドモナス・カブシユレイタスを安価な培地で培養し該菌体中からユビキノン $Q_{10}$ を抽出する方法を発表(特公昭47-7954号公報及び特公昭48-21519号公報)している。この場合のロドシウドモナス・カブシユレイタスの菌体から得られるユビキノンの収量は、各公報に記載した通り、収獲菌体 $1\text{ kg}$  10 当り約 $1.4\text{ g}$ である。

本発明者は、ユビキノン $Q_{10}$ を工業的により有利に生産するため収獲菌体中の含有量を更に増大せしめる方法について研究を重ねた結果、ビオチン及びチアミンを高濃度に培地中に存在せしめる 15 事によりユビキノン $Q_{10}$ の含有量を顕著に増加せしめることを見出し本発明を完成するに至つた。

培地中に存在するビチオン及びチアミンがユビキノン $Q_{10}$ の生産に及ぼす影響をロドシウドモナス・カブシユレイタス(微工研菌寄第879号)を用いて調べた実験例を示すと以下の通りである。 20 実験例

フラクトース $10\text{ g/l}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
 $3\text{ g/l}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1\text{ g/l}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
 $1\text{ g/l}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.2\text{ g/l}$ ,  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0.05\text{ g/l}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0.01\text{ g/l}$ , 酵母エキス $0.5\text{ g/l}$ , これに更にビオチン及びチアミン-塩酸塩を添加して、ビオチンの濃度が $2\sim 500\text{ m}\mu\text{モル}$ , チアミンの濃度が $0.04\sim 70\text{ }\mu\text{モル}$ の培地(殺菌前 30  $\text{pH } 8.3$ )を調製した。この培地 $100\text{ ml}$ を含む $500\text{ ml}$ 容振盪フラスコにロドシウドモナス・カブシユレイタス(微工研菌寄第879号)を移植し、 $27^\circ\text{C}$ で40時間振盪培養を行つた。なお、培地中の酵母エキス由来のビオチンの濃度は $2\text{ m}\mu$  35  $\text{モル}$ 、チアミンは $0.04\text{ }\mu\text{モル}$ である。

まず、チアミンの濃度を $15\text{ }\mu\text{モル}$ とし、ビオチンの濃度を $2\sim 500\text{ m}\mu\text{モル}$ の範囲で変化さ

3

せて、前記の培養をおこない、その結果を、収穫菌体中のユビキノン $Q_{10}$ の含有量との関係で示すと第1図の如くなつた。

尚、収穫菌体中のユビキノン $Q_{10}$ の含有量は、菌体からメタノール、メタノールクロロホルム混液中でユビキノン $Q_{10}$ を抽出し、この抽出液を逆相薄層クロマトグラフィーにより展開し、ユビキノン $Q_{10}$ に対応する展開部分をアルコールで抽出した後、レスター等による吸光光度法で定量して求めた（後記する実施例においても同様の方法によつた。）。10

第1図から、ユビキノン $Q_{10}$ の菌体内含有量はビオチン濃度が $5\text{ m}\mu$ を超えると急激に増大することがわかる。

次にビオチン濃度を $100\text{ m}\mu\text{モル}$ とし、チアミン濃度を $0.04\sim70\mu\text{モル}$ の範囲で変化させて、前記の培養をおこない、その結果を収穫菌体中のユビキノン $Q_{10}$ 含有量との関係で示すと、第2図の如くなつた。図から明らかな様にチアミン濃度の増加が菌体中におけるユビキノン $Q_{10}$ 含有量の増大をもたらし、この現象は、チアミンの濃度が $0.2\mu\text{モル}$ を超えると顕著になる。20

従来、発酵法によるユビキノン $Q_{10}$ の製造において、本発明の如き高濃度のビオチン及びチアミンの存在が菌体中の目的物の含有量を増大せしめる事については全く知られておらず、これは、本発明者らによりはじめて見出されたものである。25

なお、ロドシウドモナス属には増殖因子としてチアミン、ビオチン及びエコチン酸を要求するものがある。ロドシウドモナス・カプシユレイタスはこれを要求する。ビオチン及びチアミンの培地中における本発明の濃度範囲は該菌が増殖のために要求する量を十分超える量である。酵母エキス $0.5\text{ g}/\ell$ の添加のみで増殖に必要なすべての微量要素が十分満足されていることを正確に知るため対数増殖期（培養後16時間後）における菌体量を、 $660\text{ nm}$ の吸光度を測定してしらべたところ酵母エキス $0.5\text{ g}/\ell$ 添加のみの場合も、他にビオチン及びチアミンを種々の量添加した場合も吸光度は一致し、 $1.8\sim2.2$ であつて増殖速度に差がなかつた。この実験から、ビオチン及びチアミンの前記の濃度を超える範囲での使用は、増殖効果を向上させるものではなく、収穫菌体中のユビキノン $Q_{10}$ の含有量の増加に作用しているこ35 40

4

とがわかる。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明ではユビキノン $Q_{10}$ を生産する能力を有するロドシウドモナス属に属する微生物であれば野生型あるいは特定の栄養要求性、特定物質に対する抵抗性または感受性を有するものも使用可能である。これらの微生物の菌学的性質については

バージェイズ  
特公昭47-7954号公報及び(Bergey's  
マニュアルオブデターミナティブバクテリオロジ  
Manual of Determinative Bacteriology)  
第8版に詳細に記載されている。

培地に存在せしめるビオチン及びチアミンは同様の活性を有する誘導体でもよい。また、不純物としてユビキノン $Q_{10}$ の生産を阻害または生産菌の増殖を極度に抑制する如き物質を含有しないビオチン含有物及びチアミン含有物であれば廃物でも使用可能である。

本発明微生物の培養に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機塩、ビオチン、チアミン、ニコチン酸などの微量要素を程良く含有するものであれば合成培地、天然培地のいずれも使用できる。すなわち炭素源には糖、糖アルコール、有機酸及び脂肪酸とその塩、アルコール及び炭化水素などが使用でき、窒素源としてはアンモニア又はアンモニウム塩、硝酸塩、アミノ酸及びコーンステアブリカなどの天然物由来のものなどが使用できる。無機塩としては微生物一般の培養に用いる磷酸塩、マグネシウム塩、塩化ナトリウム、硫酸鉄塩、マンガン塩、重炭酸塩などを使用する。もちろん天然栄養源を炭素源や窒素源として用いたときなどに天然物中に含有する無機塩のみで満足させることが可能なこともある。

培養温度は $20\sim40^\circ\text{C}$ の範囲が適当であり、 $\text{pH}$ は $5\sim9$ 好ましくは $\text{pH}7$ 以下にならない様修正するのが望ましいが $\text{pH}7$ 以下に若干低下してもさしつかえない。 $\text{pH}$ の修正には酸、アルカリ溶液、 $\text{pH}$ 緩衝液又は有機酸の如き酸性の炭素源も使用できる。

培養終了後は培養液から遠心分離又は凝集剤等により集菌し、常法により有機溶媒による抽出又はけん化法によりユビキノン $Q_{10}$ を含有する抽出液を得、カラムクロマトグラフィーにより分画するか、有機溶媒で分配抽出してユビキノン $Q_{10}$ 画分を濃縮し、エタノールから結晶を析出せしめる。

5

この様に一般に知られるユビキノンの精製法のいかなるものでも適用可能である。

以下実施例を挙げて本発明を具体的に示す。

#### 実施例 1

水1ℓに対しフラクトース10g,  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g,  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g,  
CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.05g, FeCl<sub>3</sub> ·  
6H<sub>2</sub>O 0.01g, ビオチン10μg, チアミン・  
塩酸塩5mg, 酵母エキスを溶かしpH8.3  
に調節した。この培地中のビオチン濃度は55mμ  
モル、チアミン15μモルである。この培地を  
500mℓ容坂口フラスコへ100mℓ宛分注し  
た後、120℃, 15分間の条件で滅菌し夫々に  
ロドシウドモナス・カプシユレイタス(微工研菌  
寄第879号)を移植し27℃, 40時間振盪培  
養した。培養後遠心分離して集菌し乾燥菌体と  
して4.2gを得た。同菌体1g中のユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>含有量は3.72mgであつた。従つて培地1ℓ  
からユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>12.0mgが生産されたこと  
なる。

集菌した菌体の一部をとり、メタノールで脱水  
後、メタノール・クロロホルム(1:1)混液で  
抽出を繰返し、水を加えてクロロホルム層を得  
た。これを濃縮後n-ヘキサンで分配抽出して精  
製した。次にシリカゲルをn-ヘキサンに懸濁し  
てクロマトカラムを作つてさきのユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>抽出精製液を吸着させ、n-ヘキサン中のエチル  
エーテルの濃度を1%から7%へ増加させながら  
溶出するとユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>の画分を得た。この画  
分を濃縮し、エタノールを加えて結晶を析出させ、  
再結してユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>の結晶を得た。その後薄  
層クロマトグラフィー、紫外吸収スペクトルそ  
の他から前記結晶がユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>であることを  
確認した。

#### 実施例 2

異性化糖10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g,  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> ·  
7H<sub>2</sub>O 0.2g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.05g,  
FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.01g, ビオチン20μg  
チアミン・塩酸塩5mg, コーンステープリカー  
3gを水1ℓに溶かしpH8.3に調節した。この  
培地中のビオチン濃度は100mμモル、チアミ  
ンの濃度は15μモルである。この培地を500mℓ

6

容坂口フラスコへ100mℓづつ分注した後120  
℃, 15分間の条件で滅菌した。ロドシウドモナ  
ス・カプシユレイタスを移植し、27℃で振盪培  
養して培養中のpHを2N-NH<sub>4</sub>OHでpH7.5  
に調節し、異性化糖水溶液を培養開始後30時間  
以内に逐次添加して、初発時の添加量を加え全添  
加量が30g/ℓになる様にした。45時間培養  
後カチオン系高分子凝集剤を加えて菌体を凝集沈  
澱させて集めた。菌体収量は乾燥菌体として8g  
であつた。このときの菌体1g中のユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>の含有量は3.1mgであつた。従つて培地  
1ℓからユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>24.8mgが生産された  
ことになる。

菌体にアセトンを加えて繰返し抽出し、アセト  
ン抽出液を合わせその半量のn-ヘキサンを加え  
てユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>をn-ヘキサン層へ転溶した。  
n-ヘキサン層を濃縮液95%メタノールで洗滌  
したのちメタノール・n-ヘキサン(1:1)混  
液を加えて生じた不溶性物質を除いて精製し、濃  
縮して溶媒を留去しメタノールに溶かし、カラム  
クロマトグラフィーを行つた。カラムクロマト  
グラフィーとしてはメタノールにシリカゲル・シリ  
カゲルを懸濁させてつめた逆相カラムを使用し、  
このカラムへ前記ユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>の精製液を吸着  
させ、メタノールに水を1~3%迄増加させなが  
らグラジエント溶出を行いユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>画分を得た。このユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>画分を濃縮し、エタノ  
ールを加えて粗結晶を析出させ再結してユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>であることを確認した。

#### 実施例 3

グルコース10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3g,  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g,  
NaCl 0.2g, 酵母エキスを0.5g, ビオチン  
20μg, チアミン20mgを精製水1ℓに溶解  
し、500mℓ容坂口フラスコに100mℓづつ  
分注して120℃, 15分間滅菌して培地を作つ  
た。この培地中のビオチンの濃度は105mμモ  
ル、チアミンの濃度は60μモルであつた。これ  
にロドシウドモナス・スフエロイデスIFO12203  
を移植し、48時間振盪培養した。培養後遠心分  
離して集菌したところ菌体収量は乾燥菌体として  
3.9gであつた。ユビキノ  
ンQ<sub>10</sub>の含有量は乾燥  
菌体1g当り1.9mgであつた。従つて、培地1  
ℓからユビキノ  
ン7.4mgが生産されたことにな

7

8

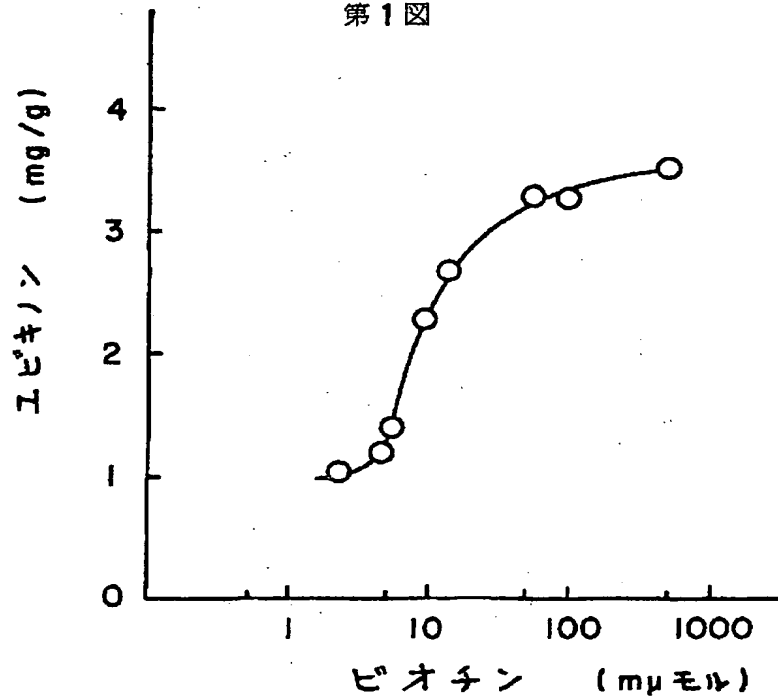
る。

次いで菌体の一部をとり10%メタノール性か性カリに加えて窒素気流中でけん化した後不けん化物をヘキサンに転溶して濃縮し、実施例1と同様にしてユビキノン $Q_{10}$ の結晶を得た。

## 図面の簡単な説明

第1図は培地中のビチオン濃度と収穫菌体中のユビキノン $Q_{10}$ 含有量との関係を示したものであり、第2図は培地中のチアミンと収穫菌体中のユビキノン $Q_{10}$ 含有量との関係を示したものである。

第1図



第2図

